

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593071

研究課題名(和文)顎裂部骨移植における幹細胞を用いた骨組織再生療法の試み 造血系幹細胞の併用

研究課題名(英文) Development of the alveolar bone tissue by using bone marrow-derived mesenchymal stem cell and hematopoietic stem cell

研究代表者

松野 美乃 (MATSUNO, MINO)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・専門研究員

研究者番号：80374544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：唇顎口蓋裂などの患者の顎裂部に対しては通常、自家骨による移植術が行われているが、細胞材料としての限界から幹細胞への期待が高まっている。本研究は顎骨部の骨欠損部における骨髄由来間葉系幹細胞の可能性に関して検討を行った。その結果、間葉系幹細胞のみを移植した場合と比較し間葉系幹細胞と造血幹細胞を併用することで、多くの骨組織が再生することが判明した。本研究により顎骨部における幹細胞を用いた再生医療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The alveolar bone grafting of the cleft lip and palate patients has been carried out by using autologous bone. However, stem cell therapy would be widely available in the regeneration of craniofacial bone defects. The purpose of this study is to examine that the possibility of the regeneration of alveolar bone tissue by using bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSC) and hematopoietic stem cell (HSC). Transplantation of both BMMSC and HSC approaches has a favorable effect on regeneration of new bone. As the result, it is considered that the using of both BMMSC and HSC is effective method for the bone regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞に代表されるように幹細胞は体内の様々な組織に分化可能であり、幹細胞を用いた再生医療は今後の医療として注目され、歯科領域においても歯の再生や骨再生などの臨床応用の可能性がある。特に矯正歯科分野では唇顎裂・唇顎口蓋裂患者における顎骨欠損部の骨再生療法として画期的な治療法となりうる。顎裂部の骨再建は、単に裂隙の形態的閉鎖にとどまらず、矯正治療後戻りの防止、歯槽堤の形成にともなう後継永久歯の萌出スペースの確保、顔面形態の改善など良好な口腔機能の達成には必要不可欠な治療である。

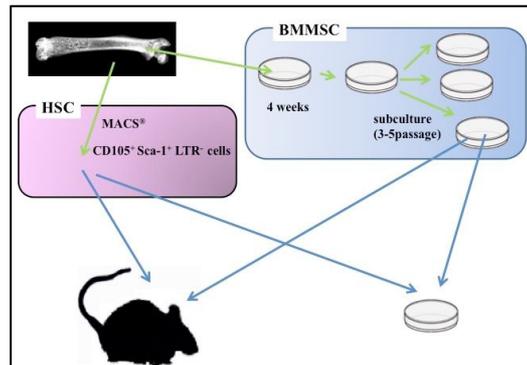
現在、自家骨移植による骨再建が行われているが、患者自身の腸骨あるいはオトガイ部の歯槽骨から採取するため、採取可能な骨量に制限があるほか、症例によっては移植した骨が吸収する場合がある。そのため、十分な骨量の確保および移植骨の生着率の向上などの改善すべき課題がある。一方、幹細胞から自家骨を再生できれば、正常な組織を損傷することなく、広範囲の顎裂欠損部の骨組織の修復が可能となる。骨髄中の間葉系幹細胞は、高い増殖能と多分化能を有し、骨形成能力が高いことが知られており、臨床では歯周病で喪失した歯槽骨の再生に成功している。しかし、再生した骨組織の量は非常に少なく、動物実験においても、広範囲の骨再生の成功例の報告はない。広範囲に骨組織を再生させるためには、移植した幹細胞を意図した細胞へと分化誘導させるメカニズムを明らかにする必要がある。臨床応用の実現には、さらなる基礎研究が必要である。

2. 研究の目的

骨髄由来間葉系幹細胞を用いた唇顎裂・唇顎口蓋裂患者の骨組織再生療法を確立することを目的とし、骨髄由来間葉系幹細胞による骨組織への分化転換機構を造血幹細胞との相互作用の観点から研究を行なった。

3. 研究の方法

C3H/He Slc マウスの大腿骨骨髄より骨髄細胞を採取した。骨髄細胞を通常に従い培養し、骨髄由来間葉系幹細胞(BMMSC)を得た。また、造血幹細胞(HSC)は、C3H/He Slc マウスの骨髄細胞より magnetic cell sorting を使用して CD105⁺ Sca-1⁺ LTR⁺ を分離して使用した。



実験の略図：マウスの大腿骨から BMMSC および HSC を採取し、培養および移植を行った。

培養条件下における BMMSC と HSC との共存培養を行い、その相互作用を検討した。また、骨分化培地における石灰化能について、アリザリンレッド染色による石灰化物の確認と、骨芽細胞の分化に関与する遺伝子である collagen1, ALP, BSP, Runx2, Osteopontin, BMP4 の mRNA の発現について検討を行った。

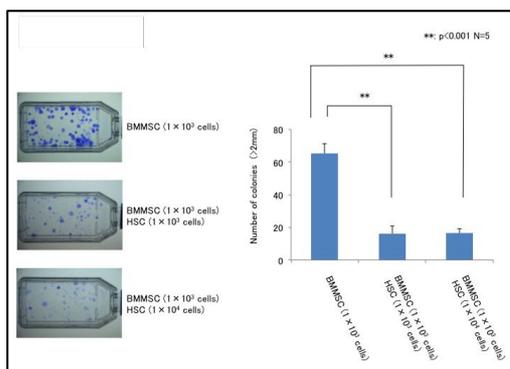
生体内における相互作用を評価するために、C3H/He Slc マウスの頭蓋部に骨欠損部を作成し、骨欠損部に BMMSC および HSC を多孔性炭酸含有アパタイトと共に移植した。移植 8 週後に移植体とその周囲組織を摘出し、再生した骨組織について検討を行った。

4. 研究成果

C3H/He Slc マウス的大腿骨骨髄より採取した BMMSC と HSC の共存培養条件におけるその相互作用を検討するため、colony forming unit fibroblast assay, BrdU assay および TUNEL assay を行なった。

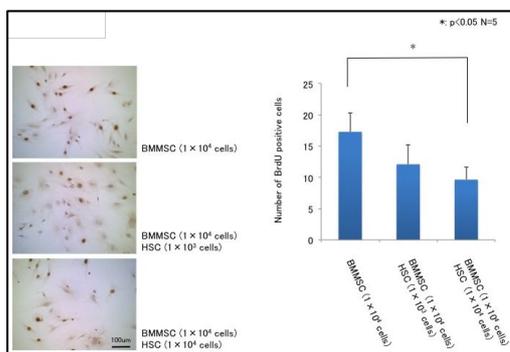
BMMSC のコロニー形成能に対して HSC がどのような影響が及ぶのかを確認したところ、HSC を作用させていない実験群では、60 個前後のコロニーが形成されるのに対し、HSC を

作用させると、形成したコロニー数は3分の1以下に抑制されていた。

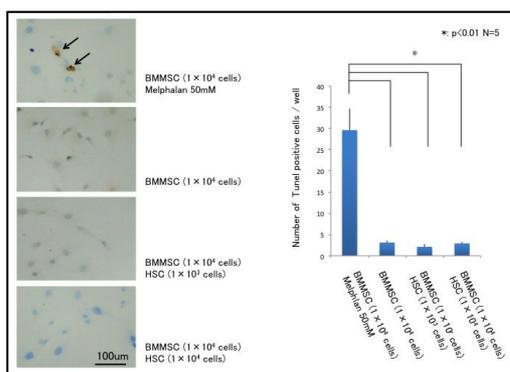


colony forming unit fibroblast assay の結果

細胞増殖能に対する影響について検討したところ、HSC を作用させない場合、BrdU 陽性細胞の割合が 15%程度であったのに対し、HSC を作用させると、陽性細胞の割合は 10%程度まで抑制された。

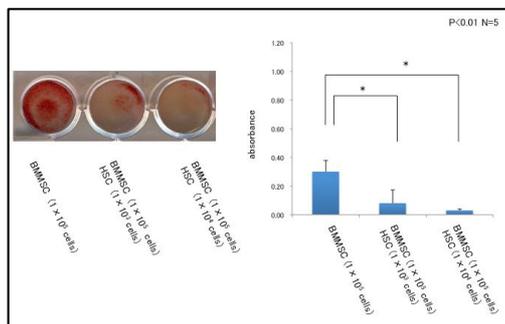


BrdU assay の結果



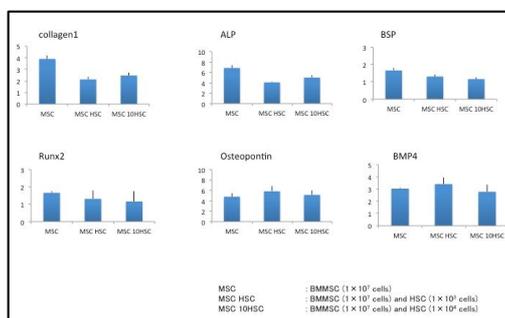
Tunel assay の結果

骨誘導条件における HSC の影響について検討したところ、HSC を作用させることで BMMSC の石灰化が抑制された。



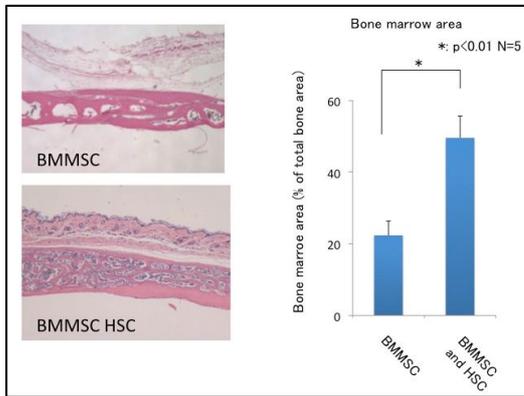
骨芽細胞誘導培地に交換後の 2 週間後の結果

また、Osteogenic marker の遺伝子発現の変動について、リアルタイム PCR を用いて検討を行ったところ、Collagen1 ALP Runx2 に関しては、発現量の低下していることが確認された。

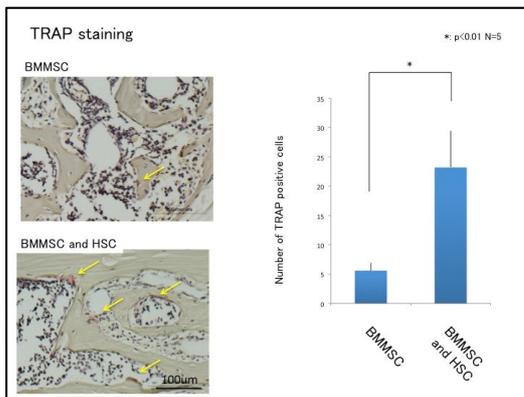


Osteogenic marker の遺伝子発現量

C3H/He Slc マウス頭頂骨部に直径 7mm 程度の大きさの骨欠損を人工的に作成し、骨欠損部位に BMMSC あるいは HSC の移植を行った。BMMSC を単独移植した場合、多孔性炭酸含有アパタイトの周囲に層板状の骨組織が再生していることが確認されたが、多孔性炭酸含有アパタイトは吸収されずに残存していた。一方、BMMSC と HSC を移植した場合は、多孔性炭酸含有アパタイトが完全に吸収され、骨梁形状を呈した骨組織が再生していた。また、再生した骨量は明らかに MMSC と HSC を移植した実験群の方が多いことが判明した。



骨欠損部における再生した骨組織



再生した骨組織における破骨細胞数 (TRAP 染色)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

菊入崇, 吉村善隆, 八若保孝: 間葉系幹細胞の骨分化機転における造血幹細胞の影響について (第31回日本小児歯科学会北日本地方会大会, 2013年10月26日, ワラッセ (青森県・青森市))

松野美乃, 菊入崇, 吉村善隆, 出山義昭, 鈴木邦明, 飯田順一郎: 間葉系幹細胞と造血系幹細胞の併用による骨組織再生療法の試み (第42回日本創傷治癒学会, 2012年12月4日, かでる2・7 (北海道・札幌市))

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 美乃 (MATSUNO Mino)

北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究員

研究者番号: 80374544

(2) 研究分担者

菊入 崇 (KIKUJIRI Takashi)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 10322819

吉村 善隆 (YOSHIMURA Yoshitaka)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 30230816

出山 義昭 (DEYAMA Yoshiaki)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 80271667

(平成26年7月8日削除)

飯田 順一郎 (IIDA Junichiro)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 90151232